# Differenzierung der alkalischen und saueren Phosphatase im Polyacrylamidgel

# Kombinierte Polyacrylamidgelelektrophoretische und biochemische Fermentnachweisreaktionen an verschiedenen menschlichen Organhomogenaten

von

Hermann Zimmerer

aus

Regensburg

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546218_0026

Aus der Abteilung für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

---

# Differenzierung der alkalischen und saueren Phosphatase im Polyacrylamidgel

# Kombinierte Polyacrylamidgelelektrophoretische und biochemische Fermentnachweisreaktionen an verschiedenen menschlichen Organhomogenaten

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
**Hermann Zimmerer**
aus
**Regensburg**

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen

Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. H. Valentin

Referent: Prof. Dr. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung: 8.8.1969

## Inhaltsverzeichnis


| | Seite |
|---|---|
| Einleitung | 1 - 2 |
| Untersuchungsgut, Versuchsanordnung, Methodik | 3 - 15 |
| Ergebnisse | 16 - 18 |
| Diskussion | 18 - 23 |
| Zusammenfassung | 24 |
| Literaturverzeichnis | 25 - 28 |

## A. Einleitung

Die Aufklärung von Isoenzymmustern hat nicht nur für die Grundlagenforschung, sondern auch für die klinische Medizin Bedeutung gewonnen. Sie gestattet in einer Reihe von Beispielen diagnostisch verwertbare Rückschlüsse aus pathologischen Serumenzymmustern auf eine organspezifische Prozessmanifestation.

Für die alkalische Phosphatase ebenso wie für die saure Phosphatase schien die quantitative Bestimmung ausreichend zu sein für klinische Fragestellungen. Bei Anreicherung z.B. dieser Phosphatasen im Patientenserum können jedoch verschiedene Organprozesse zugrunde liegen. Bei Erhöhung der alkalischen Phosphatase kann z.B. sowohl ein Verschlußmechanismus der Leber, eine Karzinose des Knochens, ein Parathyreoidismus als auch ein Morbus Paget in Frage kommen. Bei Erhöhung der sauren Phosphatase ist im wesentlichen an ein Prostatacarcinom zu denken. Erst eine Differenzierung im Sinne einer Isoenzymbestimmung würde in diesen Fällen eine weitere organspezifische Diagnostik ermöglichen und damit die Methoden der klinischen Laboratoriumsmedizin um ein wichtiges Verfahren bereichern.

Wiewohl einzelne Angaben über Isoenzyme der alkalischen wie auch der sauren Phosphatase im einschlägigen Schrifttum bekannt geworden sind (1,2b,7,10, 12,15), bedürfen derartige Befunde unseres Erachtens

noch der Überprüfung hinsichtlich ihrer klinisch diagnostischen Verwertbarkeit.

In vorliegender Arbeit wurden deshalb Studien an verschiedenen menschlichen Organhomogenaten vorgenommen mit kombinierter Elektrophorese im PAA-Gel und nachfolgendem Enzymnachweis, wobei verschiedene Enzymnachweismethoden zur Anwendung gelangten.

# B. Hauptteil

## I. Untersuchungsgut und Versuchsanordnung:

### 1. Untersuchungsgut

In vorliegender Arbeit wurden insgesamt fünf verschiedene menschliche Organe im Vergleich zu einem Humanserum analysiert. Im einzelnen kamen an Organpräparaten folgende zur Untersuchung:

| | |
|---|---|
| Leber | ( 9 verschiedene Präparate) |
| Niere | (12 " " ) |
| Prostata | ( 6 " " ) |
| Magenschleimhaut | (9 verschiedene Präparate) |
| Dünndarmschleimhaut | (4 " " ) |

Die Präparate stammten von histologisch für normal befundenen menschlichen Organen der Leiche *).

Die Verarbeitung dieser Präparate wurde 8 Stunden post mortem begonnen. Von jedem Organ wurden die verschiedenen Präparate zwar isoliert aufbereitet, für die Analysen jedoch als Pool verwendet. Desgleichen wurde ein Pool von insgesamt acht Seren von Gesunden als Vergleich zu den Organen mitangesetzt. Für den speziellen Nachweis der alkalischen Phosphatase wurden die Homogenate von Leber, Niere sowie Magen- und Dünndarmschleimhaut bevorzugt, für den Nachweis der sauren Phosphatase Leber- und Prostatahomogenat.

### 2. Versuchsanordnung

Von den obenangeführten Organpräparaten wurden Homogenate hergestellt, die gepoolt untersucht wurden. Die Analyse begann prinzipiell mit der

---

*) Wir verdanken die Präparate sowie die histologische Beurteilung der entsprechenden Schnitte Herrn Prof.Dr.Elster, Patholog. Institut der Univ.Erlangen-Nürnberg (Direktor Prof.Dr.Müller)

Elektrophorese im PAA-Gel. Unmittelbar anschliessend folgte die Fermentnachweistechnik. Für die alkalische Phosphatase wurden dabei drei verschiedene Methoden angewandt und verglichen. Für die saure Phosphatase kamen zwei verschiedene Methoden zur Anwendung. Die Methoden sind im einzelnen weiter unten angegeben. Nach Abschluß der Fermentnachweisreaktion wurden die zumeist deutlich faßbaren Farbphänomene photometrisch registriert und einem unter gleichen Bedingungen aufgetrennten Serumpool nach Amidoschwarzfärbung gegenübergestellt.

## II. Methodik

### 1. Aufbereitung der Organe (6,16a,b)

Das frische, vom Bindegewebe befreite Sektionspräparat, wurde in kleine Würfel geschnitten und etwa vier Stunden lang unter fließendem Wasser gewässert. Danach wurden die fast völlig entbluteten Organstückchen einer weiteren Zerkleinerung unterworfen, mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:2 verdünnt und unter Eiskühlung mit dem Ultra-Turax Zerstäuber homogenisiert. Der Ultra-Turax durfte dabei nur kurzfristig eingeschalten werden, um eine Überwärmung des Homogenates zu vermeiden. Ein etwa zehnmaliges kurzdauerndes Ein- und Ausschalten war für eine fast völlige Homogenisierung ausreichend. Das so gewonnene Homogenat wurde dann in Zentrifugengläser gefüllt und in der Kühlzentrifuge bei etwa 4°C., 4800 U min., 30 min. lang zentrifugiert. Der Überstand wurde dann abpipettiert und mit den anderen verschiedenen Extrakten einer Organart gepoolt. Nachdem die Gesamteiweißkonzentration des betreffenden Pools bestimmt war,

wurde der Pool durch Dialyse gegen 20% Kollidon eingeengt. Die Dialyse war abgeschlossen, wenn der Pool eine Gesamteiweißkonzentration von 4 g% aufwies.

2. Polyacrylamidgelelektrophorese

Seit der Einführung von PAA-Gel als Träger für Elektrophorese durch RAYMOND und WEINTRAUB (13) hat sich dieses synthetische Gel als vielseitig verwendbar erwiesen (4a,b; 11,19). Die Trennung eines Eiweißgemisches im PAA-Gel erfolgt wie im Stärkegel nicht nur nach verschiedener Ladung, sondern auch nach dem Molekulargewicht, beziehungsweise der Molekülkonfiguration der Komponenten.

a) Apparatur

Als Bodenplatten wurden 8 cm lange und 4 cm breite Platten aus normalem Tafelglas verwendet, die mit einem 1 cm breiten Glasrand von 2 mm Höhe blasenfrei und wasserdicht umklebt waren. Erforderlich war außerdem eine Deckplatte von gleicher Länge und Breite wie die Bodenplatte. Als Puffertrog wurde eine Multelphorkammer *) für Papier- und Cellogelstreifenelektrophorese gewählt; es kann aber jede beliebige Ausführung einer Elektrophoresekammer mit geeigneter Breite Verwendung finden.

b) Vorbereitung der Platten

Um eine Auftragstelle zu erhalten, die ein strähnenfreies Abwandern der Proteine in das Gel gestattet, wurde vorher auf die Unterseite der Deckplatte etwa 2 cm vom kathodischen Kammerrand entfernt, ein 1 mm dicker und

---

*) der Fa.Dr.Bender & Dr.Hobein, München, Lindwurmstraße

0,5 cm breiter Agarstreifen angelegt, der auf die Breite der Bodenplatte zugeschnitten wurde.

Herstellung des Agarstreifens:

Aufbereiteter Agar wird aufgekocht bis er flüssig ist, etwa 2 ml davon abpipettiert und auf einen sauberen Objektträger verteilt. Nach wenigen Minuten ist der Agar erstarrt und kann in Streifen (Abmessungen s.o.) geschnitten werden.

c) Herstellung des Polyacrylamidgels

Die beste Auftrennung des Humanserums gelang durch ein sogenanntes diskontinuierliches Puffersystem, d.h. durch Verwendung verschiedener Pufferlösungen, eine im Gel, die andere in den Puffertrögen der Elektrophoresekammer. Als Gelpuffer wurde ein Tris (hydroxymethyl) - aminomethan-Borat-Puffer gewählt, als Elektrophoresepuffer ein Boratpuffer.

Als Ausgangsstoff für die Gelgewinnung wurde Cyanogum *) verwendet, das durch Versetzen mit Katalysatoren gelige Beschaffenheit annimmt. Herstellung eines Tris-Boratpuffergemisches, bestehend aus einem Tris-Zitronensäurepuffer und einem Borsäure-Natronlaugepuffer:

Tris-Zitronensäurepuffer

In einem Mischkolben zu 1000 ml wird eine 2,54 molare Trislösung hergestellt. Hierzu werden 307,7 g Tris **) abgewogen, in etwa 500 ml Aqua dest. gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt.

---

*) Fa.Serva, Heidelberg
**) Fa.Merck, Darmstadt

In einem weiteren Kolben mit geringerem Fassungsvermögen wird eine 2,54 molare Zitronensäurelösung hergestellt. Hierzu werden 66,7 g Zitronensäure *) abgewogen und ad 125 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

515 ml der Trislösung (2,54 m) und 60 ml Zitronensäurelösung (2,54 m) werden nunmehr gemischt. Es ergibt sich der Tris-Zitronensäurepuffer.

Boratpuffer

25,35 g Borsäure *) (1,094 m) und 5,5 g Natriumplätzchen *) (1,094 m) werden in Festform abgewogen und in einem Mischkolben ad 500 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

Herstellung einer Tris - Borat - Stammlösung.

Mischen von 12,2 ml Trispuffer und 5 ml Boratpuffer = 17,2 ml Stammlösung. Als nächster Arbeitsgang wurden 33 g Cyanogum abgewogen und nach Zusatz von 17,2 ml Stammlösung auf 500 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Die Cyanogumlösung ist dann 6,6 %ig.

Gebraucht werden schließlich eine 0,66 %ige Ammoniumpersulfat *) (AP-) Lösung (etwa 50 ml) sowie eine DMAPN-Lösung **) ( = Dimethylaminopropionnitril).

d) Beschicken der Glasplatten mit PAA-Gel

Von der gepufferten Cyanogumlösung wurden 50 ml abpipettiert und zwecks Vernetzung mit 5 ml einer 0,66 %igen AP-Lösung und 5 ml einer DMAPN-Lösung versetzt. Dabei wird so vorgegangen, daß zuerst die AP-Lösung unter Rühren zugegeben wird, dann erst - ebenfalls unter

---

*) Fa.Merck, Darmstadt
**) Fa.Serva, Heidelberg

Rühren - die DMAPN-Lösung. Die nun mit den Katalysatoren versetzte, gepufferte Cyanogumlösung muß zügig in die vorbereiteten Platten gegossen werden, da Polymerisation erfolgt (die Lösung erstarrt sonst im Becherglas!).

Nachdem nun wie geschildert, die gepufferte Cyanogumlösung in die Platten gegossen wurde, muß schnell die Deckplatte mit dem darauf befindlichen Agarstreifen aufgelegt werden. Dabei ist zu beachten, daß der Flüssigkeitsüberschuß luftblasenfrei entfernt wird, was am besten durch schräges Auflegen der Deckplatte, die völlig frei von Fettspuren und Wasser sein muß, gelingt.

Nach etwa 30 min. wird dann die Kammer vorsichtig geöffnet und der Agarstreifen aus dem Gel herausgenommen. Die am Streifen freigegebene Rinne soll eine klebrige Konsistenz zeigen. Nun werden Filterpapierstreifen zurechtgeschnitten, die in ihrer Breite kleiner als die Rinnenbreite sein und eine solche Länge aufweisen sollen, daß drei Streifen in der Rinne Platz haben. Diese Streifen werden mit dem zu untersuchenden Serum bzw. Homogenat durchtränkt und nach Abtupfen des Proteinüberschusses an den rechten Rand der Rinne gelegt. Für Seren wurden die Streifen zweifach, für Homogenate dreifach genommen. Dabei ist es wichtig, daß die Streifen genau übereinanderliegen und einen Abstand zu der nächst folgenden Lage haben. Zum Schutz vor Austrocknung wird über die Auftragerinne ein etwa drei cm breiter PVC-Streifen gelegt. Die Platte wird nunmehr in die Elektrophoresekammer gebracht und durch Filtrierpapier (doppelte Lage aus Elektro-

phoresefiltrierpapier d.Fa. Schleicher & Schüll Nr.586 von den Abmessungen der Kammerbreite von 4 cm Länge) an beiden Seiten mit den gefüllten Puffertrögen verbunden; das gesamte Gel wird schließlich mit einer PVC-Folie bedeckt. Nach Auflegen der Glasdeckplatte liegt die Folie glatt auf dem Gel.

e) Elektrophorese

Als Elektrophoresepuffer dient Boratpuffer (pH 8,5). Hierzu werden 50,7 g Borsäure (1,094 m) und 10,9 g (1,94 m) Natriumplätzchen abgewogen und in einem Mischkolben auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Bei Gebrauch wird dieser Puffer im Verhältnis 1:2 verdünnt, d.h. es werden 350 ml entnommen und 700 ml Aqua dest. dazugegeben und gleichmäßig auf die Puffertröge verteilt.

An der PAA-Platte werden 50 V Gleichstrom angelegt. Nach etwa 7 Stunden ist die Elektrophorese beendet. Die durchwandernde Boratfront ist bereits nach 2 Stunden an einer gelblichen, strichförmigen Verfärbung des Gels, die anodenwärts wandert, zu erkennen. Ist diese gelbe Boratfront am anodischen Ende angekommen, so kann die Elektrophorese abgebrochen werden. Dabei ist die Boratfront identisch mit den Präalbuminen.

3. Verschiedene Phosphatasenachweise:

a) Für die alkalische Phosphatase

aa) Nach der Azokupplungsmethode (1,11)

Im Prinzip handelt es sich um folgende Reaktion. Bei einem pH-Optimum von 9,0 wird durch Einwirkung der alkalischen Phosphatase

von dem Substrat Natrium-naphthyl (1) phosphat Phosphat bzw. Phosphorsäure fermentativ abgespalten. Aus Natriumnaphthylphosphat entsteht Natriumaphthol, welches an das Diazoniumsalz des 4 Chlor-o-toluidin gebunden wird. Der so entstandene Azofarbstoff dient zum Nachweis der alkalischen Phosphatase. Dabei steht der entstandene Farbstoff bzw. dessen Farbintensität in einem bestimmten Konzentrationsbereich in einem direkt proportionalen Verhältnis zur Aktivität des Fermentes (lineare Abhängigkeit).

Schema:

$$\text{Na-naphthylphosphat} + \text{HOH} \xrightarrow{\text{Alkal.Ph.}} \text{Na-naphthol} + \text{Phosphorsäure}$$

$$\text{Na-naphthol} + \text{Diazoniumsalz des 4 Chlor-o-toluidin} \longrightarrow \text{Azofarbstoff}$$

Als Reagenzien werden zunächst ein Tris-HCl-Puffer vom pH 9,0 benötigt. Dazu löst man 6,09 g Tris in 250 ml Aqua dest. Von dieser Lösung werden 62,5 ml entnommen und mit 6,25 ml 0,2n HCl-Lösung gemischt ( + Trispuffer pH 9,0). Zu dieser Pufferlösung gibt man 1,65 g Natriumnaphthyl (1) - phosphat *) ( = 25 mmolare Lösung) und 250 mg Fast red TR **) (1 mg/ml Inkubationslösung) und füllt auf 250 ml auf. Die Lösung wird filtriert.

Daran schließt sich folgender Arbeitsgang.

Nach Abheben der Glasdeckplatte und der Deckfolie wird das Gel in einer Wanne, gefüllt mit Aqua dest., unter Hin- und Herbewegen vorsichtig gelöst. Darauf wird das Gel etwa 45 min.

---

*) Fa.Merck, Darmstadt

**) Chroma Ges.Schmid & Co., Stuttgart-Untertürkheim

bei 25°C in der Inkubationslösung gehalten. Nach abgelaufener Reaktion wird das Gel eine Stunde mehrmals mit Wasser gewaschen, um den Substratüberschuß zu entfernen.

bb.) Nach der Bleikonservierungsmethode (1,11)

Im Prinzip handelt es sich um folgende Reaktion. Bei einem pH Optimum von 9,0 wird durch fermentative Spaltung mit Hilfe der alkalischen Phosphatase von dem Substrat Natrium-ß-glycerophosphat Phosphat bzw. Phosphorsäure abgespalten. In Gegenwart von Kalziumionen wird nun dieses freigesetzte Phosphat in schwerlösliches, d.h. schwach dissoziiertes Ca-phosphat übergeführt und bleibt somit am Ort der abgelaufenen Fermentreaktion gebunden. In einer weiteren Reaktion mit Bleiionen wird dieses Ca-Phosphat bei einem pH von 7,0 in das noch geringer dissoziierte Pb-Phosphat übergeführt. Die Reaktion verläuft nach dem Massenwirkungsgesetz; demzufolge werden durch Pb-Ionen die in geringer Konzentration vorliegenden Phosphationen des Ca-Phosphats als Pb-Phosphat ausgefällt. Dadurch wird nicht dissoziiertes Ca-Phosphat in Lösung gebracht, solange, bis sich die Konzentration des vorhandenen Ca-Phosphats erschöpft hat.

Schließlich wird das entstandene Pb-Phosphat in Reaktion mit einer 5 %igen Ammoniumsulfidlösung gebracht. Es bildet sich schwarzbraunes, unlösliches Bleisulfid. Auch diese Reaktion verläuft nach dem Massenwirkungsgesetz, indem die in geringer Konzentration vorhandenen Pb-Ionen des Pb-Phosphats durch Sulfidionen als PbS ausgefällt werden und dadurch nicht dissoziiertes Pb-Phosphat in Lösung geht.

Schema:

1) Na-ß-glycerophosphat + $Ca^{++}$ $\xrightarrow[+\ HOH]{\text{Alkal.Ph.}}$

$Ca_3\ (PO_4)_2$ + Na-ß-glycerin

2) $Ca_3\ (PO_4)_2 + 3\ Pb\ (NO_3)_2 \longrightarrow$

$Pb_3\ (PO_4)_2 + 3\ Ca\ (NO_3)_2$

3) $Pb_3\ (PO_4)_2 + 3\ (NH_4)_2S \longrightarrow$

$3\ PbS\downarrow + 2\ (NH_4)_3PO_4$

Als Reagenzien werden zwei verschiedene Inkubationslösungen benötigt.

Inkubationslösung I

Es wurden 6,05 g Tris in 250 ml Aqua dest. gelöst. Von dieser Lösung wurden 62,5 ml entnommen, mit 6,25 ml 0,2n HCl *) versetzt ( = Tris-HCl-Puffer pH 9,0), 4g Natrium-ß-glycerophosphat *) (50 mmolar) und 416,2 mg Calciumclorid*) 15 mmolar) dazugegeben und ad 250 ml aufgefüllt.

Inkubationslösung II

Es werden 6,05 g Tris und 5,8 g Maleinsäure*) abgewogen und mit Aqua dest. auf 250 ml aufgefüllt. Von dieser Lösung werden 62,5 ml entnommen, mit 60 ml 0,2n Natronlauge *) versetzt ( = Tris-Maleatpuffer pH 7,0), 248,4 mg Bleinitrat *) (3 mmolar) dazugegeben und mit Aqua dest. auf 250 ml aufgefüllt. Die Lösung wird vor Gebrauch filtriert. Benötigt wird außerdem noch eine 5%ige Ammoniumsulfidlösung **).

Daran schließt sich folgender Arbeitsgang.
Das Gel wird zunächst 30 min. bei 25°C in der Inkubationslösung I gehalten. Darauf wird das

---

*) Fa.Merck, Darmstadt
**) Riedel-de Haen A.-G., Seelze-Hannover

Gel kurz einmal mit Aqua dest. gewässert, danach 30 min. bei 25°C in der Inkubationslösung II belassen.

Nach abgelaufener Reaktion wird das Gel eine Stunde lang wiederholt mit Aqua dest. gewaschen, indem man das Wasserbad alle 10 min. wechselt. Dann wird das Gel 2 min. in 5 %iger Ammoniumsulfidlösung inkubiert und später des öfteren mit Aqua dest. gewaschen.

PS: Bevor das Gel in die Ammoniumsulfidlösung gelegt wird, empfiehlt es sich, ein kleines Stückchen Gel an einer Ecke abzuschneiden, um zu prüfen, ob das überschüssige Bleinitrat aus dem Gel vollständig herausgewaschen wurde. Ist dies nicht der Fall, so färbt sich das Gelstückchen sofort schwarz an.

cc.) Methode mit Natrium-Phenolphthaleindiphosphat (8,9)

Der Nachweis der alkalischen Phosphatase mit Hilfe von Phenolphthalein wurde nach dem Prinzip der Methode von HUGGINS und TALALEY (in 8) vorgenommen, d.h. es wurde der im Gel enthaltenen alkalischen Phosphatase Phenolphthaleindiphosphat als Substrat zur hydrolytischen Spaltung angeboten, nach einer bestimmten Zeit die Reaktion durch Alkalisierung mit Glykokollpuffer pH 11,6 abgebrochen und die dabei rote Farbe des freigesetzten Phenolphthaleins photometrisch ausgewertet.

Folgende Reagenzien fanden Verwendung:

1. Alkalische Substrat-Pufferlösung (Reagenz I)
   10,3 g Veronalnatrium
   6,5 $cm^3$ n/10 Natronlauge
   0,304 g Na-Phenolphthaleindiphosphat *)

wurden auf 500 $cm^3$ mit Aqua dest. aufgefüllt und zur Konservierung wurden 3,75 $cm^3$ Chloroform hinzugefügt.

2. Glykokollpuffer (Reagenz II)
   4,595 g Glykokoll p.A.*)
   0,85 Natriumazeteat p.A.
   3,585 g Natriumchlorid
   50 ml 1n Natronlauge (karbonatfrei)

Die Substanzen wurden in 400 ml aufgekochtem Wasser gelöst, 20,0 g Natriumpyrophosphat *) zugegeben und auf 500 ml mit aufgekochtem Aqua dest. aufgefüllt.

Arbeitsgang:

Das Gel wurde nun 4 Stunden bei 37°C in Reagenz I inkubiert. Anschließend wurde die Farbreaktion durch Einbringen des Gels in Reagenz II ausgeführt.

b) Für die saure Phosphatase (2a,b,c; 3,9):

Im Prinzip verläuft der Nachweis der sauren Phosphatase nach einer Azokupplungsreaktion, ähnlich wie sie schon zum Nachweis der alkalischen Phosphatase beschrieben wurde. Das pH-Optimum liegt hier bei 5,0. Als Ausgangssubstrat wurde Natriumnaphthyl (1) phosphat und als Diazoniumsalz Fast Garnet GBC-Salz verwendet.

Als Reagenzien werden zunächst ein Veronal-Azetat-Puffer mit dem pH von 5,0 benötigt. Dazu werden 4,9 g Natriumazetat *) und 7,36 g Barbitalnatrium *) abgewogen und ad 250 ml Aqua dest. aufgefüllt. Von dieser Lösung werden 50 ml entnommen und mit 88 ml 0,1 n HCl, 20 ml Natriumchloridlösung *) (Veronal-Azetat-

---

*) Fa.Merck, Darmstadt

puffer pH 5,0), 250 mg Natriumnaphthyl (1) phosphat (1 mg/ml Inkubationslösung) und 250 mg Fast Garnet GBC-Salz *) (1 mg/ml Inkubationslösung) ad 250 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

Daran schließt sich folgender Arbeitsgang:

Das Gel wird 12-16 Stunden lang bei 4°C in der Inkubationslösung über Nacht im Eisschrank gehalten. Dann wird mehrmals mit Aqua dest. gewaschen, um den Substratüberschuß zu entfernen.

4. Amidoschwarzfärbung

Zur Darstellung der Eiweißfraktionen im Humanserum bzw. in den Organextrakten, wird das Gel etwa 25 Stunden lang unter leichtem Hin- und Herbewegen mit Amidoschwarz angefärbt. Nach Entfärbung mit einem Methanol-Wasser-Essigsäuregemisch (Verhältnis 5:5:1) über Nacht, stellen sich die einzelnen Fraktionen dar.

Proteinfärbung mit Amidoschwarz 10 B:

Herstellung der Färbelösung:
1 g Amidoschwarz 10 B **) in 1 l eines Gemisches von AcetatpufferpH 3,7 und Glycerin **) 15% lösen.
Acetatpuffer:
500 ml Essigsäure (60 ml Eisessig auf 1 l)
500 ml Acetatlösung (Natriumacetat · 3 $H_2O$, 13,6 g auf 1 l)
Zu 850 ml Puffer werden 150 ml Glycerin gegeben.

5. Photometrische Auswertung und photographische Dokumentation

Die Auswertung bzw. Dokumentation der Farbreaktionen, d.h. der gefärbten, fermentativen Fraktionen, erfolgte einerseits photometrisch***), andererseits photographisch.

---

*) Chroma Ges.Schmid & Co., Stuttgart-Untertürkheim
**) Fa.Merck, Darmstadt
***) Integralschreiber d.Fa.ZEISS, Oberkochen (Filter FE 53)

## III. Ergebnisse (Abb. 1 - 3)

### 1. Ergebnisse mit der Reaktion zum Nachweis der alkalischen Phosphatase

Für den Nachweis der alkalischen Phosphatase wurden die Homogenate von Leber, Niere, Magen- und Dünndarmschleimhaut im Vergleich mit einem Normalserum gewählt. Dabei war festzustellen, daß bei Anwendung der Azokupplungsmethode im Homogenat der Leber, der Niere, der Magen- und Dünndarmschleimhäute jeweils zwei relativ schmalbasige Komponenten regelmäßig zur Darstellung gelangen. Im Leberhomogenat erwies sich die eine unter ihnen als weiter anodisch gewandert ($Ph_I$) und schärfer begrenzt, die zweite imponierte als relativ breitbasiger Komplex ($Ph_{II}$) und insgesamt schwächer gefärbt (Abb. 2).

Mit Bezug auf die mit Amidoschwarz gefärbten Proteinkomponenten der jeweils entsprechenden Organhomogenate, fand sich die weiter anodisch gewanderte Fraktion $Ph_I$ in einem Bereich der Transferrine, die Fraktion $Ph_{II}$ im Bereich der Haptoglobin 2-2 Komponenten. Eine Differenzierung dieses Komplexes gelang in nur wenigen Fällen. Die quantitativ reichste Ausbeute war im Leberhomogenat. Es erwies sich aber auch der Nierenextrakt als relativ reich an alkalischer Phosphatase.

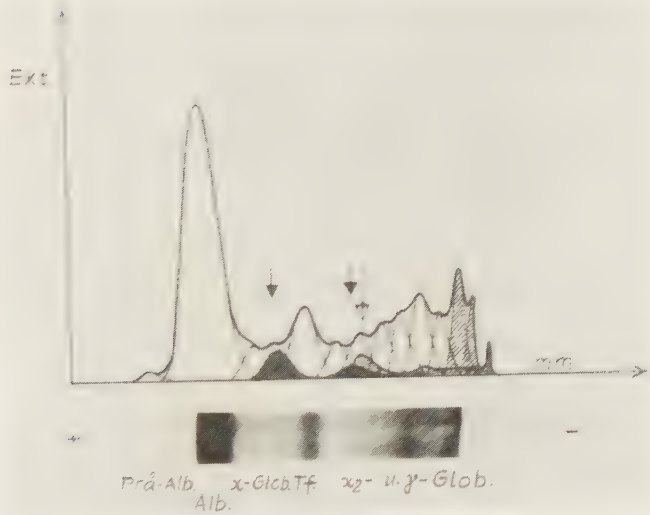


Abb. 1 Diagramme der mit Amidoschwarz gebärbten Proteinfraktionen eines im PAA-Gel getrennten menschlichen Serums sowie der mit der Azokupplungsmethode darstellbaren Fraktionen ( Isoenzyme ) der alkalischen und sauren Phosphatase ( Anreicherung ).

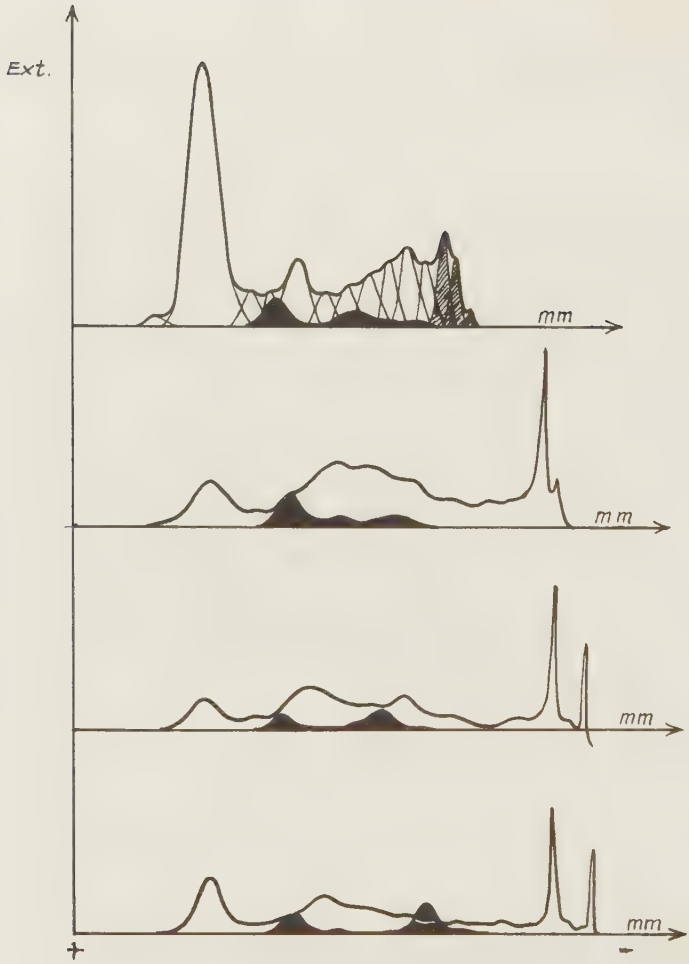


Abb. 2 Darstellung der Isoenzyme der alkalischen Phosphatase im Serum ( angereichert ) sowie in verschiedenen Organhomogenaten ( Leber, Herzmuskel, Magenschleimhaut )

Im menschlichen Serum konnte bei vorliegender Technik lediglich eine Farbspur im Transferrinbereich nachgewiesen werden.

Mit der Bleikonservierungsmethode konnte im allgemeinen nur eine Fraktion aufgezeigt werden; sie entsprach der $Ph_I$. Dabei ergaben sich, gemessen an der Intensität der Farbreaktion, die gleichen quantitativen Reaktionen mit Bezug auf die Organherkunft, wie sie auch mit der Azokupplungsmethode nachgewiesen wurden.

Die Ergebnisse der Reaktion mit Natriumphenolphthaleindiphosphat waren für das PAA-Gel nicht auswertbar. Es ergab sich lediglich im Schleimhautextrakt des Dünndarms eine flüchtige Farbreaktion im Bereich des Startes und eine Komponente, die am ehesten der $\beta_1$-Tf-Fraktion zuzuordnen war.

2. Ergebnisse mit der Reaktion zum Nachweis der sauren Phosphatase (Abb. 3):

Zum Nachweis der sauren Phosphatase wurden in vorliegender Versuchsanordnung Prostatahomogenat und Leberextrakt analysiert.

Die hier verwertbare Fermentnachweisreaktion war die Azokupplungsmethode. Hiermit gelang die Darstellung von 2 Komponenten im Prostatahomogenat und der Nachweis einer Fraktion im Leberextrakt.

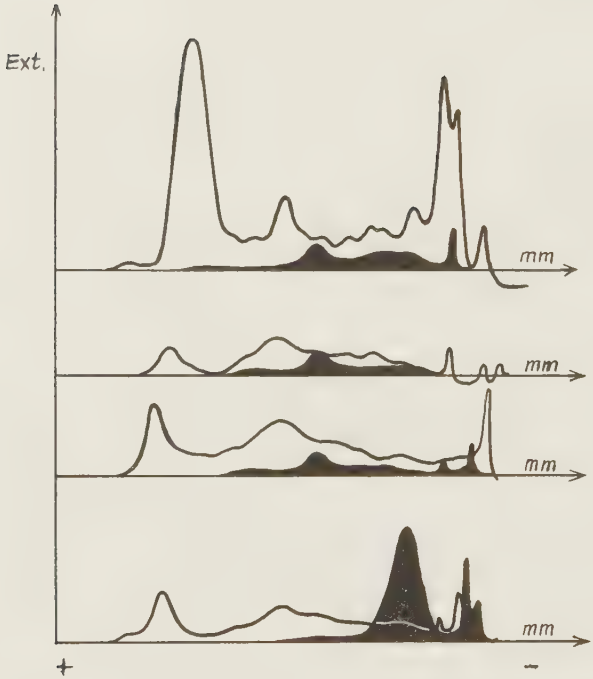


Abb. 3 Darstellung der Isoenzyme der sauren Phosphatase im Serum ( angereichert ), in zwei verschiedenen Leberhomogenaten sowie im Homogenat der Prostata.

Die in den verschiedenen Organen nachgewiesenen sauren Phosphatasekomponenten unterschieden sich deutlich durch ihre elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit bzw. ihrer Position innerhalb des Proteinsystems, sowie durch ihre Intensität: Im Prostatahomogenat zeichneten sich die sauren Phosphatasen an umschriebener Stelle im $\beta_1$-Globulin- und $\alpha_2$-Globulin bzw. Hp 2-2 Bereich ab, während die saure Phosphatase des Leberextraktes unmittelbar anodisch vor der Auftragsstelle als intensiv gefärbte, relativ scharf begrenzte Fraktion imponierte, ein Bereich, der entweder makromolekularen $\alpha$-Clobulinen, oder Immunglobulinen mit ebenfalls hohem Molekulargewicht entspricht.

Im Serum von Gesunden war mit vorliegender Methodik die saure Phosphatase nicht darstellbar.

Die Bleikonservierungsmethode unter Abwandlung des pH erbrachte kein verwertbares Ergebnis.

## IV. Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse haben mit Bezug auf den Nachweis der alkalischen Phosphatase in Kombination mit der PAA-Gel-Elektrophorese gezeigt, daß von den drei geprüften Methoden für die praktische Handhabung und Auswertung die Azokupplungsmethode die günstigsten Ergebnisse bot. Hinsichtlich der Empfindlichkeit scheint zwar die Bleikonservierungs-

methode der vorgenannten etwa um das Zweifache überlegen zu sein. Das stimmt überein mit Studien von ALLEN und HYNCIK (1), die allerdings festgestellt haben, daß die Bleikonservierungsmethode viermal so empfindlich sei als die Azokupplungsmethode. STEPAN sowie BÖRNIG (5) verwendeten für ihre Studien zum Nachweis der alkalischen Phosphatase in Rattenseren und Rattenleberextrakten die Azokupplungsmethode unter Einführung von Echtblausalz BB und kamen zu Ergebnissen, die mit den hier vorliegenden Befunden an menschlichen Leberhomogenaten vergleichbar sind.

Die früher im eigenen Arbeitskreis für die Agarelektrophorese ausgearbeitete Methode zum Nachweis der alkalischen Phosphatase unter Verwendung von Phenolphtalein, ließ sich im PAA-Gel praktisch nicht auswerten; die Farbreaktionen waren trotz wesentlich längerer Inkubation mit der ersten Substratlösung nur sehr oberflächlich und flüchtig, wie auch unscharf begrenzt, so daß eine exakte Zuordnung der Farbentwicklung zu einer Proteinfraktion nicht möglich war.

In Leberhomogenaten konnten mit Regelmäßigkeit 2 Komponenten, $Ph_I$ und $Ph_{II}$, aufgezeigt werden, die als Isoenzyme aufzufassen sind. Hinsichtlich der Zuordnung der gefundenen Fraktionen mit alkalischer Phosphataseaktivität entspricht die mit $Ph_I$ bezeichnete Isoenzymfraktion einer Proteinkomponente mit

der Wanderungsgeschwindigkeit des $\beta_1$-Transferrins, die $Ph_{II}$-Fraktion einem Protein bzw. Proteinkomplex mit der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit einer mehr kathodenwärts gelegenen Komponente, vom Typ eines makromolekularen $\alpha_2$- oder eines schneller wandernden $\gamma$-Globulins.

Die weniger schnell gewanderte Fraktion $Ph_{II}$ imponierte als Komplex, der seinerseits in Einzelfällen eine Differenzierung in 2 Subfraktionen wahrnehmen ließ. Wenn es gerechtfertigt erscheint, Leberhomogenate verschiedener Spezies zu vergleichen, so stehen die vorliegenden Befunde im Einklang mit Ergebnissen von STEPAN und Mitarbeitern (5), die exakt 2 Isoenzyme darstellen konnten. Es gelang den Autoren nachzuweisen, daß die weiter anodisch gelegene Fraktion der alkalischen Phosphatase der Zellkernfraktion, die weniger weit gewanderte (in Nähe der Auftragestelle gelegene) alkalische Phosphatase dem Isoenzym aus der Mitochondrienfraktion entspricht.

Von den hier untersuchten menschlichen Organhomogenaten ergab sich eine einheitliche Isoenzymkonstellation, d.h. es konnten keine qualitativen Varianten von Organ zu Organ festgestellt werden. Es ergaben sich lediglich Relationsunterschiede, die darin bestanden, daß z.B. im Leberhomogenat die $Ph_I$ relativ stärker zur Darstellung gelangte als die $Ph_{II}$, wohingegen etwa im Nierenhomogenat die beiden Kompo-

nenten gleich stark in Erscheinung traten. Eine Unterteilung der $Ph_{II}$ war weder im Nierenhomogenat noch in den Schleimhautextrakten des Magens und des Dünndarms möglich. Im menschlichen Serum (nicht eingeengt) war mit Regelmäßigkeit eine, in einigen Fällen eine weitere, vielfach sogar gedoppelte Phosphatasekomponente nachweisbar. Es handelte sich zumeist um Typen des $Ph_{I}$-Isoenzyms. Die Farbintensitäten waren zwar ausreichend, um eine photometrische Registrierung zu ermöglichen und damit eine spätere Zuordnung zum Proteinsystem. Sie genügten jedoch nicht, um die Methode in vorliegender Fassung als diagnostisch verwertbare mit exakten Relationsangaben zu verwenden.

Ein Vergleich der vorliegenden Befunde mit den Ergebnissen von HAIJE und DE JONG (7), sowie mit denjenigen von PEACOCK und Mitarb. (12) ist unseres Erachtens insofern nicht ohne weiteres möglich, als in vorliegender Versuchsanordnung ein anderes Elektrophoresemedium, nämlich PAA-Gel verwendet wurde, das sowohl mit Bezug auf die Position der getrennten löslichen Proteine, als auch mit Bezug auf die biochemischen Nachweisreaktionen bekanntlich wesentliche Unterschiede gegenüber anderen Elektrophoresemedien wie Agargel, Zellogel oder Papier aufweist.

Die Ergebnisse zum Nachweis der <u>sauren Phosphatase</u> haben zunächst eindeutig erkennen lassen, daß methodisch die Azokupplungsmethode unter Änderung des

Wirkungsoptimums für eine Beurteilung quantitativer und qualitativer Verhältnisse fermentaktiver Fraktionen geeignet ist. Diese Methode prüfte 1960 BARKA (2a) unter Verwendung von Nachweismethoden, die bereits 1955 von RUTENBERG und SELIGMANN (15) inauguriert und für histochemische Demonstrationen verwendet wurden. BARKA und Mitarb. (2b,c; 3) prüften die Technik an Rattenleberhomogenaten. Sie fanden 3 Isoenzyme, unter welchen die am weitesten anodisch gewanderte durch dessen Farbintensität am meisten imponierte.

Die vorliegenden Ergebnisse an den untersuchten Organhomogenaten weisen darauf hin, daß Leber- und Prostataphosphatase offenbar hochspezifische (organspezifische) Isoenzyme besitzen, die sich untereinander durch Zahl, Konzentration und Position innerhalb der elektrophoretisch aufgetrennten Proteinfraktionen deutlich unterscheiden: Während die Prostata 2 (bis 3) Isoenzyme mit der Wanderungsgeschwindigkeit von $\beta_1$- und schnell wandernden $\gamma$-Globulinen aufweist, findet sich die Gesamtheit der Phosphataseaktivität im Homogenat der Leber in einem extrem kathodisch (unmittelbar vor der Auftragestelle) gelegenen Bezirk, als eine gedoppelte, intensiv gefärbte Enzymfraktion. Im Serum eines Gesunden war die Aktivität offenbar so gering, daß der Nachweis der sauren Phosphatase in gegebener

Versuchsanordnung nicht gelang.

Das vorliegende Gesamtergebnis stellt in erster Linie eine methodische Bereicherung für die Nachweisreaktionen von Phosphatasen im PAA-Gel dar. Dieses neue Elektrophoresemedium hat für Fermentfarbreaktionen den Vorteil, daß es keine Eigenfärbung und keine Fluoreszenz besitzt, daß es chemisch indifferent ist und daß es zufolge seiner geringen Diffundierbarkeit durch Lösungen und insbesondere der langsamen Diffusion von Proteinen im Gel selbst nur minimale (praktisch keine) störende Diffusionseffekte aufweist und daß infolgedessen Inkubationslösungen nach elektrophoretischer Trennung von Proteingemischen, die Schärfe der Fraktionen nicht beeinträchtigen.

Erst in zweiter Linie sollte diese Studie zur Frage über Isoenzymmuster der alkalischen und sauren Phosphatase in verschiedenen Organhomogenaten beitragen, eine Studie freilich, die der systematischen Fortsetzung bedarf.

## C. Zusammenfassung:

Zum Nachweis von Isoenzymen der alkalischen und sauren Phosphatase wurden insgesamt 40 Präparate von menschlichen Organen homogenisiert, mit Hilfe der PAA-Elektrophorese aufgetrennt und dann mit verschiedenen spezifischen enzymatischen Reaktionen unter Farbentwicklung nachgewiesen. Es handelte sich bei den einzelnen Präparaten um 9 verschiedene Leber-, 12 verschiedene Nieren-, 6 verschiedene Prostata-, 9 verschiedene Magenschleimhaut- und 4 verschiedene Dünndarmschleimhautpräparate.

Die Ergebnisse zeigten, daß sich methodisch die Azokupplungsreaktion sowohl für den Nachweis der alkalischen, als auch für den Nachweis der sauren Phosphatase am besten bewährte. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten in den Homogenaten von Leber, Niere, Magen- und Dünndarmschleimhaut jeweils 2 alkalische Phosphatasekomponenten aufgezeigt werden. Die saure Phosphatase der Prostata kam in 2 bis 3 Komponenten zur Darstellung, während die saure Phosphatase der Leber als eine einzelne, breitbasige und extrem kathodisch gelegene Komponente nachweisbar war.

## Literaturverzeichnis:

1. ALLEN, J.M. and G.HYNCIK:
Localization of alkaline phosphatases in gel matrices following electrophoresis.
J.Histochem. Cytochem. 11, 169-175 (1963)

2a) BARKA, T.: A simple azo-dye method for histochemical demonstration of acid phosphatse.
Nature, 187, 248-249 (1960)

2b) BARKA, T.: Studies of acid phosphatase in electrophoretic separation of acid phosphatase of rat liver on polyacrylamide gels.
J.Histochem. Cytochem., 9, 542 (1961)

2c) BARKA, T.: Studies on acid phosphatases. Chromatographic separation of acid phosphatases of rat liver.
J.Histochem. Cytochem. (In press)

3. BARKA, T. and I.HOLZNER:
Studies on the heterogenity of specific phosphatases of the liver.
Ier Congress International d'Histochimie et de Cytochimie,
Paris 1960 (In press)

4a) BIEL, H. und O.ZWISLER:
Nachweis und Charakterisierung von Proteinen des menschlichen Serums mittels PAA-Gel-Elektrophorese und angeschlossener Immundiffusion.
Behringwerk-Mitteilungen 46, 14f (1966)

4b) BIEL, H. und O.ZWISLER:
Z.klin.Chem. (im Druck)

5. BÖRNIG, H., J.STEPAN, A.HORN und R.GIERTLER:
Intracelluläre Verteilung der Isoenzyme der alkalischen Phosphatase der Rattenleber und ihr Verhalten nach Unterbindung des Ductus choledochus.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.348, 1311-1318 (Oktober 1967)

6. GÖTZ, H. und F.SCHEIFFARTH:
Immunoelektrophoretische Untersuchungen an Organextrakten.
Klin.Wochenschrift 41, 587-589 (1963)

7. HAIJE, W.G. and M.De JONG:
Iso-enzyme patterns of serum alkaline phosphatase in agar-gel electrophoresis and their clinical significance.
Clin.chim.Acta 8, (620-623) (1963)

8. HENNING, N.:Klinische Laboratoriumsdiagnostik.
Urban u.Schwarzenberg
München-Berlin-Wien 1966

9. HERMANS, P.E., W.F. Mc GUCKIN, B.F. Mc KENZIE and E.D.BAYRD: Electrophoretic studies of serum proteins in cyanogum gel.
Staff Meet. Mayo Clinic 35, 792-807 (1960)

10. JOHNSON, E.M. and R.SPINNZZI:
Differentiation of alkaline phosphatase and glucose-6-phosphatate dehydrogenase in rat yolk-sac.
J.Embryol.exp.Morph.Vol.19, 137-143 (1968)

11. MAURER, H.R.:
Disk-Elektrophorese
Theorie und Praxis der diskontunierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese.
Walter de Gruyter & Co. Berlin 1968

12. PEACOCK, ANDREW C., GARNER and VIVIAN:
Separation of serum alkaline phosphatases in normal subjekts by continuous-flow electrophoresis.
Clin.Chim.Acta 8, (314-317) (1963)

13. RAYMOND, S. und L.WEINTRAUB:
Acrylamide gel as a supporting medium for zone elektrophoresis.
Science 130, 711 (1959)

14. REITH, A. und F.W.SCHMIDT:
Über Isozyme der sauren Phosphatase und ihre intracelluläre Lokalisation in der menschlichen und der Rattenleber.
Klin.Wschr. 42, 915-918 (1964)

15. RUTENBURG, A.M. and A.M.SELIGMAN:
The histochemical demonstration of acid phosphatase by a postincubation coupling technique.
J.Histochem.Cytochem. 3, 455-470 (1955)

16a) SCHEIFFARTH, F., H.GÖTZ und M.GROTTKE:
Vergleichende biochemische Untersuchungen an unterschiedlich aufbereiteten Leberextrakten.
Clin.Chim.Acta 20, 455-464 (1968)

16b) SCHEIFFARTH, F., H.GÖTZ und M.GROTTKE:
Vergleichende biochemische Untersuchungen an unterschiedlich aufbereiteten Magenschleimhautextrakten.
Acta histochemica (im Druck)

17. SCHEIFFARTH, F., H.WARNATZ und H.GÖTZ:
Zum qualitativen und quantitativen Nachweis der alkalischen Phosphatase im Serum mit Hilfe der Agarelektrophorese.
Med.Welt Nr.43, 2216-2220 (1961)

18. SCHEIFFARTH, F., H.GÖTZ, H.WARNATZ und K.KOCH:
Agarelektrophoretische Studien über das Verhalten der alkalischen Phosphatase bei Leberkranken.
Gastroenterologie 2, 345-348 (1964)

19. ZWISLER, O. und H.BIEL:
Elektrophorese in horizontalem Polyacrylamidgel.
Z.klin.Chem. 4, 58 (1966)

Herrn Professor Dr. F. Scheiffarth möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas und die Übernahme des Referats herzlich danken.

Ein besonderes Anliegen ist es mir, Frau Privatdozentin Dr. H. Götz, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, meinen Dank auszusprechen.

# Lebenslauf

Ich, Hermann Heinrich Karl Zimmerer, Sohn des (am 11.September 1943) gefallenen Gerichtsassessors Hermann Zimmerer und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Schönhärl, wurde am 17.Dezember 1942 zu Regensburg geboren und röm.-kath. getauft.

Nach dem Besuch der Grundschule (von 1948-1953 an meinem Geburtsort) war ich von Sexta bis Prima Schüler der Oberrealschule für Jungen an der Goethestraße zu Regensburg. Hier legte ich auch - am 17.Juli 1963 - die Reifeprüfung mit Erfolg ab.

Mein Medizinstudium begann ich im Wintersemester 1963/64 in Erlangen. Nach bestandenem Vorphysikum und Physikum studierte ich im Wintersemester 1966/67 in Wien. Die restlichen klinischen Semester absolvierte ich wiederum in Erlangen.

Am 30. Juli 1969 habe ich in Erlangen das med. Staatsexamen abgelegt.

**Offsetdruck-Fotodruck**

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990